



Distinct mechanisms of mucus release from mucous neck cells and surface mucous cells in the rabbit stomach studied by video microscopy

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松下, 功 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1123

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 270号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏 名	松 下 功		
論文題目	Distinct mechanisms of mucus release from mucous neck cells and surface mucous cells in the rabbit stomach studied by video microscopy (ビデオ顕微鏡で明らかにしたウサギ胃頸部粘液細胞および表層粘液細胞における異なる粘液分泌機序)		

博士(医学) 松下 功

論文題目

Distinct mechanisms of mucus release from mucous neck cells and surface mucous cells in the rabbit stomach studied by video microscopy

(ビデオ顕微鏡で明らかにしたウサギ胃頸部粘液細胞および表層粘液細胞における異なる粘液分泌機序)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

胃底腺領域には表層粘液細胞、頸部粘液細胞という2種類の粘液分泌細胞が存在する。しかし、それぞれの細胞の分泌反応を区別して定量することが困難であるため、これらの細胞のアゴニストや分泌様式は明らかではなかった。ビデオ強化式微分干渉顕微鏡は生きた細胞を無染色、高倍率で観察でき、光学的スライシングによって組織の断面像を得ることが可能である。本研究は、この方法を用いて、胃底腺領域の2種類の粘液分泌細胞の分泌過程をリアルタイムで可視化し、その分泌機序を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕

ウサギ腹部大動脈にカニューレーションし、磷酸緩衝液で灌流後、胃体部の胃粘膜を筋層から機械的に剥離した。その胃粘膜をコラゲナーゼとディスパーゼを含む溶液中に37°Cで45分間静置することにより、胃小窩と胃腺が結合した腺管を単離した。その中から、実体顕微鏡下で表層から腺底部まで連続して観察可能な腺管を選んで、チェンバー内に置き、37°Cの生理塩溶液で灌流しつつ種々の薬物で刺激した。

薬物に対する胃粘液分泌細胞の反応は、100倍の対物レンズを装着した微分干渉顕微鏡 (Axiovert35, Zeiss) で観察した。微分干渉像は1/2インチのCCD型ビデオカメラでビデオ信号とし、画像処理装置 (PIP-4000, ADS) によってリアルタイムにコントラストの増強を施した。胃表面像ならびに腺管断面像を14インチモニター上で最終倍率4000倍で観察した。

〔結果〕

1) 頸部粘液細胞における粘液分泌反応

頸部粘液細胞は、大型の壁細胞に囲まれ、細胞内にPAS陽性の分泌顆粒を認める細胞として同定できた。カルバコール (10–100 μ M) の刺激によって、顆粒が明るさを急速に変化させ消失するという開口放出 (exocytosis) 反応が多数起こった。この細胞は、ガストリン (2 μ M)、PGE₂ (1 μ M)、ATP (1mM)、8Br-cAMP (3mM) 刺激によっても低頻度に開口放出反応を示したが、ヒスタミン (1mM)、A 23187 (Ca²⁺ ionophore, 3 μ M)、TPA (PKC activator, 1 μ M) 刺激では同じ反応を示さなかった。

2) 表層粘液細胞における粘液分泌反応

表層粘液細胞は、敷石状に並び、細胞内に小型の分泌顆粒を認める細胞として同定できた。表層粘液細胞は、低頻度 (0.22 $\pm$ 0.12/min/cell) ながら自発的な開口放出を行っていた。この反応は PGE₂ (10nM–1 μ M) 刺激により増強され、インドメサシン (30 μ M) 投与で抑制された。この細胞では、ATP (1mM)、8Br-cAMP (3mM)、A23187 (3 μ M) 刺激によっても開口放出反応は増加したが、カルバコール (100 μ M)、ガストリン (2 μ M)、ヒスタミン (1mM) 刺激による応答は見られなかった。

表層粘液細胞を機械的に刺激することにより、開口放出が高頻度に関り粘液が放出し尽くされる現象 (massive exocytosis) を観察することができた。この反応は、細胞外液中の Ca^{2+} を除去することにより完全に抑制された。稀ではあるが、胃小窩から表層粘液細胞自体が抜け落ちる現象 (cell exfoliation) も捉えることができた。

〔考察〕

頸部粘液細胞がカルバコール、ガストリンに感受性をもつことは、食物摂取時の腺管内自己消化を防ぐ働きに適した特徴であると考えられた。表層粘液細胞が酸分泌刺激剤に感受性を持たないことは、胃内腔の酸、消化酵素に対する恒常的な防御に適した特徴であると考えられた。

〔結論〕

頸部粘液細胞の粘液分泌様式は exocytosis のみであった。カルバコール、ガストリン、 PGE_2 、ATP 刺激はこの細胞の exocytosis を引き起こした。表層粘液細胞の粘液分泌様式は exocytosis, massive exocytosis, cell exfoliation の3種類であった。 PGE_2 、ATP、機械刺激はこの細胞の exocytosis を引き起こしたが、酸分泌刺激剤であるカルバコール、ガストリン、ヒスタミンは刺激効果を持たなかった。

論文審査の結果の要旨

これまで胃底腺領域に存在する粘液分泌細胞である表層粘液細胞、頸部粘液細胞それぞれのアゴニストや分泌様式は明らかではなかった。申請者は、ビデオ強化式微分干渉顕微鏡を用いて、生きた細胞を無染色、高倍率で観察し、光学的スライシングによる組織の断面像を得て胃底腺領域の2種類の粘液分泌細胞の分泌過程をリアルタイムで可視化し、その分泌機序を明らかにした。

ウサギ胃体部の胃粘膜を筋層から機械的に剥離し、その胃粘液をコラゲナーゼとデイスパーゼ混合溶液中に37℃で45分間静置することにより、胃小窩と胃腺が結合した腺管を単離した。表層から腺底部まで連続して観察可能な腺管を選び、チェンバー内で37℃のリンガー溶液で灌流しつつ種々の薬物で刺激した。薬物に対する胃粘液分泌細胞の反応は、100倍の対物レンズを装着した微分干渉顕微鏡で観察した。微分干渉像は1/2インチの CCD 型ビデオカメラでビデオ信号とし、画像処理装置によってリアルタイムにコントラストの増強を施した。胃表面像ならびに腺管断面像を14インチモニター上で最終倍率4000倍で観察した。

頸部粘液細胞における粘液分泌反応：頸部粘液細胞は、大型の壁細胞に囲まれた、PAS陽性分泌顆粒を細胞内に持つ細胞として同定できた。この細胞は、カルバコールの刺激によって、顆粒が暗から明へと急速に明るさを変化させた後消失するという開口放出 (exocytosis) 反応が多数認められた。その他、ガストリン、 PGE_2 、ATP、8Br-cAMP 刺激によっても開口放出反応を示したが、ヒスタミン、A23187 (Ca^{2+} ionophore)、TPA (PKC activator) 刺激では反応を示さなかった。

表層粘液細胞における粘液分泌反応：表層粘液細胞は、敷石状配列と、細胞内の小型の分泌顆粒により同定でき、低頻度 ($0.2 \pm 0.1/\text{min/cell}$) の自発的な開口放出を行っていた。この反応は PGE_2 刺激により増強され、インドメサシン投与で抑制された。ATP、8Br-cAMP、A23187 刺激によっても開口放出反応は増加したが、酸分泌刺激剤であるカルバコール、ガストリン、ヒスタミン刺激による応答は見られなかった。また、ガラス微小電極による機械的刺激により、 Ca^{2+} 依存性の高頻度の開口放出 (massive exocytosis) を観察することができた。稀に、胃小窩から表層粘液細胞自体が抜け落ちる現象 (cell

exfoliation) も観察された。

頸部粘液細胞がカルバコール、ガストリンに感受性をもつことから、食物摂取時の腺管内自己消化を防ぐ働きに適した特徴であると考えられた。また、表層粘液細胞が酸分泌刺激剤に感受性を持たないことは、胃内腔の酸、消化酵素に対する恒常的な防御に適した特徴であると考えられた。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 腺管腔の径に部位差はあるか、またそれは刺激により変化するか
- 2) 頸部粘液細胞と表層粘液細胞では細胞のジャンクションに差があるのか
- 3) 粘液層を構成する粘液の割合は頸部粘液細胞と表層粘液細胞とでどういう比率か
- 4) cAMPが関与する開口放出はPKAによるリン酸化を介するのか、あるいは直接作用するのか
- 5) 頸部粘液細胞におけるアゴニスト、酸分泌刺激剤による開口放出に cAMP が関与し、 Ca^{2+} は関与しないのか、表層粘液細胞におけるそれらの作用は別のメカニズムによるのか
- 6) プレパレーションによるダメージによって開口放出の頻度に差がでてこないか
- 7) インドメサシンによる自発的開口放出抑制の時間経過は PGE_2 合成阻害と矛盾しないか
- 8) アゴニストの種類によって開口放出頻度の応答パターンに差があるのはなぜか
- 9) massive exocytosisも通常の開口放出と同じメカニズムでおこるのか
- 10) massive exocytosisに必要な Ca^{2+} 流入の経路は何か、機械的刺激以外ではみられないのか
- 11) 表層粘液細胞のexfoliationが起こる頻度はどの程度か、頸部粘液細胞にはみられないのか
- 12) exfoliationはアポトーシスなのか、そのときのタイトジャンクションはどうなっているか
- 13) 防御因子の低下による胃潰瘍の成因に頸部粘液細胞と表層粘液細胞のどちらの関与が大きいのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 福田 敦 夫

副査 教授 梶 村 春 彦 副査 助教授 今 野 弘 之